

포장재 조건에 따른 365 nm UV-LED 조사의 *Bacillus subtilis* 생육 억제 효과

이다혜¹, 정소미², 쉬시아오통¹, 김꽃봉우리², 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

Received: December 12, 2018 / Revised: February 14, 2019 / Accepted: February 27, 2019

Inhibition Effect of *Bacillus subtilis* on 365 nm UV-LED Irradiation According to Packaging Materials

Da-Hye Lee¹, So-Mi Jeong², Xiaotong Xu¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², and Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Department of Food Science and Technology/Institute of Food Science, ²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

The use of ultraviolet (UV) spectroscopy for foods is known to have a microbial inhibitory effect. UV-A having a longer wavelength than UV-C can be used for continuous or intermittent UV irradiation of food stored in containers or packages. Because UV-LED can be used effectively at a low price, this study reported the effect of UV-A 365 nm-LED on inhibiting *Bacillus subtilis* in accordance with the packaging conditions employed in daily use. The packaging materials were linear low-density polyethylene (LLD-PE), nylon/low density polyethylene (LDPE), polystyrene, and glass. When all packaging materials were treated with 365 nm UV-LED, *B. subtilis* was observed to remain inactive for 30–60 min. Further, compared with the control ($-\log 5$), the survival rate of *B. subtilis* was $-\log 2.0$ – 2.5 for nylon/LDPE and $-\log 2.58$ – 3.61 for LLD-PE. These packaging materials showed an excellent inhibitory effect regardless of their thickness. Typically, a decrease in the viable cell count of more than 3 log indicates a 99.9% bactericidal effect. These results suggest that 365 nm UV-LED permeated the packaging material and inhibited bacterial growth.

Keywords: Ultraviolet light-emitting diode, *B. subtilis*, bactericidal control effect

서 론

식품산업에서 유해 미생물을 원인으로 한 식품의 부패와 변질은 세균성 식중독을 유발하고, 이로 인해 식품안전성에 대한 위협과 큰 경제적 손실을 야기시킨다. 특히, 가공식품의 경우 가공, 저장 및 유통과정에서 미생물 오염으로 인한 식품의 부패와 변질 가능성이 높기 때문에 철저한 살균처리와 위생적 관리로 식품의 안전성을 확보하는 것이 중요하다 [1]. 식품 중 열에 취약하거나 민감한 제품 또는 가열 처리가 불가능한 제품의 경우는 비가열 살균기술을 적용해야 하는데, 전자기선은 이러한 식품의 살균방법으로 유용하게 사용

되고 있다. 또한 전자기선은 의료도구의 살균, 화학 산업 및 병원 방사선 치료 등 다양한 산업에서 사용되고 있다 [2, 3].

전자기 스펙트럼 중 자외선(UV)은 100–400 nm 범위의 파장으로, 특히 살균 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. UV는 파장의 길이에 따라 크게 UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm), UV-C (100–280 nm)로 구분되는데 [4], 현재 식품의 살균 및 소독에 주로 사용되고 있는 것은 UV-C 영역의 파장으로 저압 수은 램프를 사용하고 있다. 하지만 저압 수은 램프는 빛 에너지와 열 에너지가 동시에 발생해 소비전력 면에서 비효율적이고, 인체에 유해한 UV가 방사되기 때문에 노출 시 위험하다는 단점이 있다 [5]. Light-emitting diode (LED)는 가장 효율이 높은 광원으로 알려져 있다 [2]. LED는 열이 발생하지 않아 에너지 손실이 적고, 인체에 유해한 UV가 방사되지 않을 뿐만 아니라 램프의 수명이 길어 유지비용이 적다는 장점이 있어 저압 수은 램프의 단점을 보

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

완할 수 있다[5].

UV는 미생물에 포함되어 있는 물분자를 수산화 라디칼이 생성되도록 하여 DNA 가닥에 손상을 일으키고, DNA 구조를 파괴함으로써 세포를 사멸하는 원리로 미생물을 살균 하는 것으로 알려져 있다[6]. 또한 UV는 파장이 짧을수록 더 많은 에너지를 낼 수 있어 광화학 산화 과정을 유도할 확률이 더 높아진다[7]. 따라서 UV-C는 UV 영역 중 가장 많은 에너지를 낼 수 있어 살균 효과가 가장 뛰어나지만, 단파장이기 때문에 투과력이 비교적 약해 제품 표면의 미생물에만 영향을 미칠 수 있다. UV-A 또한 세포 내에 슈퍼옥사이드 라디칼, 수산화 라디칼 및 과산화수소 라디칼 등의 활성산소종(ROS)을 생성하여 미생물의 DNA 사슬을 손상시켜 미생물을 사멸한다고 알려져 있다[8-10]. 그러나 UV-A는 파장이 길어 식품 내부까지 침투할 수 있어 식품 내부에 있는 미생물에 영향을 미칠 수 있다. Mori 등[8]은 수산업에서 UV-A (365 nm)를 이용한 물 살균 시스템을 연구한 바 있고, Lante 등[11]은 과일과 채소의 절단면에 UV-A (390 nm)를 조사하는 방법을 식품 공정의 전처리에 적용하여 UV-A의 살균효과를 입증하였다. 하지만 식품 산업 및 가정에서 흔히 사용되고 있는 식품 포장재를 대상으로 한 UV-A의 살균 효과에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 식품 살균의 유효성을 유지하고, 식품안전성을 확보하기 위해 각종 식품 포장재와 365 nm UV-LED를 이용하여 *Bacillus subtilis*의 생육 억제 효과를 조사하였고, 365 nm UV-LED를 이용한 효과적인 살균 처리 기술의 산업적 이용 가치를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Korea)에서 *Bacillus subtilis*를 분양받아 사용하였다.

365 nm UV-LED 광원

실험에 사용된 UV-LED 소자는 365 nm 단일 파장이며, 실험장비는 가로 26 cm, 세로 13.5 cm 크기의 판을 제작한 후 판 하부에 LED 소자 40개를 가로, 세로 2 cm 간격으로 부착하여 제작하였다. 전류 전원은 AC adapter (0-8 A, 0-24 V)를 이용하여 공급하였으며, 전압은 24 V로 설정하였다.

365 nm UV-LED 조사 시 포장재의 조건에 따른 *B. subtilis*의 생육 억제 효과

균주를 5 ml의 nutrient broth (NB; Acumedia Co., USA)에 접종해 35°C에서 24시간 1차 배양하였고, 1차 배양

한 균주 100 μ l를 취해 nutrient agar (NA) 배지에 도말하였다. 균주를 도말한 배지에 365 nm UV-LED 램프를 사용하여 조사하였고, 램프와 배지와는 4.5 cm, 조사 강도는 25 W/cm²의 조건에서 진행하였다. *B. subtilis*에 조사 시 petri dish 위에 유리를 덮어 조사하였으며, 실험에 사용한 유리의 두께는 2.0 \pm 0.1 mm, 3 mm, 5 mm로 달리하였다. 다양한 포장 재질 중 식품 산업에 흔히 사용되는 포장 재질 세 가지를 선택하였다. 가정용 랩은 크린랩 사의 선상저밀도 폴리에틸렌(LLD-PE)으로 두께가 10 nm인 것을 사용하였다. 진공포장지의 경우, 외부 재질은 나일론, 내부 재질은 LDPE로 구성된 적층 포장지로 두께가 90 μ m인 것을 사용하였다. 플라스틱은 Crystal-grade polystyrene (PS)로 두께가 0.78 mm인 것을 사용하였다. 조사 시간은 30분, 60분, 120분, 180분으로 하였고, 조사 시 배지 표면의 온도는 30-35°C로 일정하게 유지하였다. 조사가 끝난 뒤 petri dish의 뚜껑을 닫고 광재활성화를 방지하기 위해 어두운 곳에 두었다가, 35°C에서 18시간 배양하여 형성된 집락수를 계수하였다. 집락수를 계수하여 희석배수를 곱하였고, log 값을 취한 균 생존 비율을 아래 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{Log survival ratio} = \text{Log} (N_t/N_0)$$

N_t : UV-LED를 조사한 샘플의 집락수

N_0 : UV-LED를 조사하지 않은 대조구의 집락수

결 과

365 nm UV-LED 조사 시 LLD-PE(가정용 랩) 두께에 따른 *B. subtilis*의 생육 억제 효과

실험에 사용한 LLD-PE의 두께는 10 nm와 20 nm로, 20 nm의 경우 10 nm의 LLD-PE를 두 겹으로 겹쳐서 사용하였다. LLD-PE의 두께에 따른 *B. subtilis* 생육 억제 효과를 관찰한 결과(Fig. 1), 30분이 되는 시점에서 10 nm와 20 nm 두 경우 모두 *B. subtilis* 생육이 급격히 감소하였으며, 그 이후에도 계속 감소하는 경향을 보였다. 총 180분 동안 빛을 조사하여 생존율을 log 값으로 나타낸 결과, 10 nm 두께에서는 약 -log 2.58, 20 nm 두께에서는 약 -log 3.61으로 *B. subtilis*에 대한 생육 억제 효과를 보였다. 하지만 LLD-PE의 두께에 따른 균 생육 억제 효과의 차이는 미미한 것으로 나타났다.

365 nm UV-LED 조사 시 nylon/LDPE(진공포장지) 두께에 따른 *B. subtilis*의 생육 억제 효과

본 연구에서는 포장 재질을 Nylon/LDPE로 하여 90, 180, 270 및 360 μ m의 두께에서 *B. subtilis*에 대한 생육 억제 정도를 관찰하였다(Fig. 2). 조사 시간이 길어지는 동안 비슷한

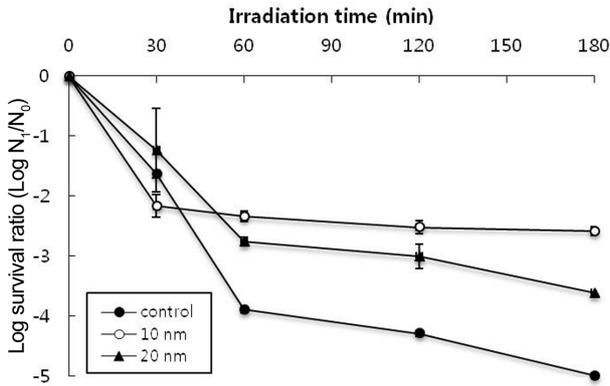


Fig. 1. Inactivation of *B. subtilis* by ultraviolet A (UV-A) light-emitting diode irradiation on LLD-PE packaging material with various thickness.

폭으로 생존율이 감소하였다. 총 120분 동안 빛을 조사하여 생존율을 log 값으로 나타낸 결과, 90 μm 에서는 약 $-\log 2.75$, 180 μm 에서는 약 $-\log 2.78$, 270 μm 에서는 약 $-\log 2.81$, 360 μm 에서는 약 $-\log 2.97$ 로 Nylon/LDPE의 두께 차이는 생육 억제 효과에 거의 영향을 미치지 않았다.

365 nm UV-LED 조사 시 PS (polystyrene) 두께에 따른 *B. subtilis*의 생육 억제 효과

포장재로 PS를 사용하여 0.78 mm와 1.56 mm의 두께에서 *B. subtilis*에 대한 생육 억제 정도를 관찰하였다(Fig. 3). 0.78 mm의 두께의 경우, 60분이 되는 시점에서 *B. subtilis*의 생존율은 약 $-\log 2.30$ 으로 30분째의 생존율인 $-\log 0.48$ 에 비해 약 $\log 1.82$ 만큼 크게 감소하였다. 시간에 따라 *B. subtilis*의 생존율이 점차 감소하여 180분 되는 시점에서의 생존율은 약 $-\log 3.29$ 로 $\log 0.83$ 만큼 크게 감소하였다.

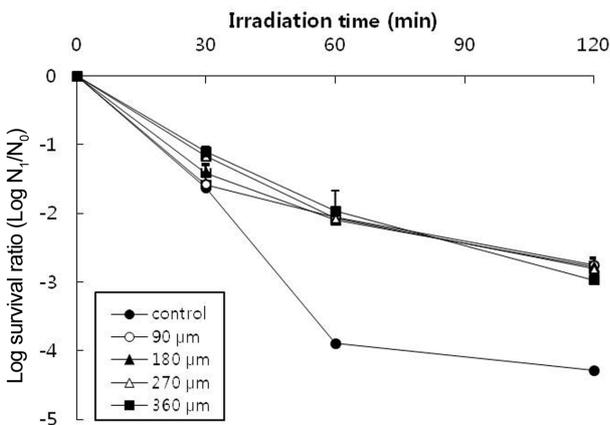


Fig. 2. Inactivation of *B. subtilis* by ultraviolet A (UV-A) light-emitting diode irradiation on nylon/LDPE packaging material with various thickness.

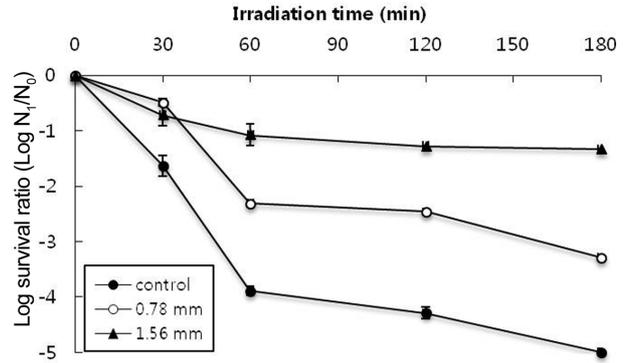


Fig. 3. Inactivation of *B. subtilis* by ultraviolet A (UV-A) light-emitting diode irradiation on crystal-grade polystyrene (PS) packaging material with various thickness.

1.56 mm의 두께의 경우, 30분에서의 생존율은 약 $-\log 0.07$, 60분에서는 약 $-\log 1.07$, 120분에는 약 $-\log 1.27$, 180분에는 약 $-\log 1.33$ 으로 시간이 지날수록 생존율은 감소하였지만, 0.78 mm의 두께에 비해 감소폭이 크게 증가하지는 않았다. 최종 생존율 또한 약 $-\log 1.33$ 으로 생육 억제 효과는 0.78 mm의 두께에 비해 미미하였다.

365 nm UV-LED 조사 시 유리 두께에 따른 *B. subtilis*의 생육 억제 효과

UV-A (320–400 nm)는 파장이 길어 실내 유리를 통과할 만큼 투과력이 뛰어나며, 4 mm 두께의 유리에 UV-A (315–400 nm)를 조사한 연구 결과, 7.4 W/cm^2 의 조사강도에서의 투과율이 74.3%로 보고되어 있다[12]. 본 연구에서는 유리 두께별(2, 3 및 5 mm) 365 nm UV-LED를 조사하여 *B. subtilis*에 대한 생육 억제 정도를 관찰하였다. 그 결과(Fig.

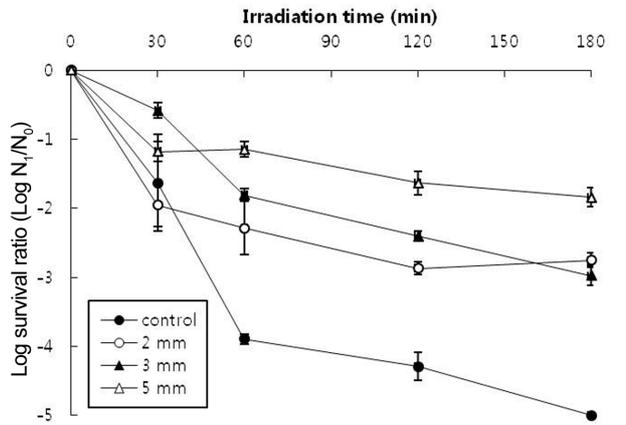


Fig. 4. Inactivation of *B. subtilis* by ultraviolet A (UV-A) light-emitting diode irradiation on glass packaging material with various thickness.

4), 365 nm UV-LED 조사 후 30분째에 모든 조건의 *B. subtilis*의 생존율이 급격히 감소하였으며, 이 후 계속해서 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 이 중 감소폭이 가장 큰 것은 3 mm의 두께로, 시간이 지날수록 약 $\log 0.5$ 간격으로 꾸준히 감소하였다. 총 180분 동안 빛을 조사하여 *B. subtilis*의 생존율을 \log 값으로 나타낸 결과, 2 mm 두께에서는 약 $-\log 2.75$, 3 mm 두께에서는 약 $-\log 2.97$, 5 mm 두께에서는 약 $-\log 1.84$ 로 가장 두꺼운 유리에서 가장 낮은 생육 억제 효과를 보였다. 다른 포장 재질은 *B. subtilis*의 생존율이 $-\log 2-3$ 인 것에 비해 유리는 $-\log 1-2$ 로 *B. subtilis*의 생존율이 더 높게 관찰되었고, UV-A의 경우, 유리 투과력이 비교적 약한 것으로 확인되었다.

고 찰

UV를 이용한 식품의 살균 처리 기술 및 포장재에 따른 투과력에 관한 연구는 주로 UV-C에 국한되어 있다. PET, PVC, PP 및 PE 재질의 플라스틱 필름에 대한 UV-C (200–280 nm)의 투과율 및 미생물 사멸 효과에 관한 연구[13], PET/PE (0.063 mm) 필름으로 감싼 PET/EVOH/PE (0.4 mm) 트레이와 PA/PE (0.090 mm) 파우치 포장에 UV-C 조사 후, 저장 기간 동안 미생물의 증식 유무에 대한 연구[14] 등에 의해 UV-C의 미생물 생육 억제 효과가 식품의 저장 중 유통기한을 향상시키는데 기여한다고 보고되고 있다.

본 연구에 이용된 포장재들은 일반적으로 식품 포장 시 가장 흔하게 사용되고 있다. LLD-PE는 레토르트파우치와 가정용 랩으로 유용하게 사용되고 있는 포장재질이며, LD-PE는 연포장용 필름이나 일회용 장갑 및 봉지, 마요네즈 및 케첩류의 연질성 용기, 우유나 주스용 종이팩 등 라미네이트 포장재 내층으로 주로 사용된다. 또한 PS는 PE, polypropylene (PP) 등과 함께 식품 포장에 많이 사용되는 재료로 무색 투명하고 가벼워 저온 유통되는 식품용 트레이, 병 또는 컵 등에 사용된다[15]. 본 연구를 통해 LLD-PE, nylon/LDPE 및 PS의 포장재는 365 nm UV-LED 조사시, *B. subtilis*의 생존율이 약 $-\log 2-3$ 범위로 확인되었다. 이에 따라, 365 nm UV-LED 조사를 일반적으로 사용되고 있는 식품 포장재에 적용할 경우, *Bacillus subtilis*를 비롯한 미생물 생육 억제를 통하여 식품의 저장 및 식품 품질의 향상을 기대할 수 있을 것으로 예측된다. 반면 유리 포장재의 경우, *B. subtilis*의 생존율이 약 $-\log 1-2$ 의 범위로 앞서 언급한 3 종류의 포장재에 비해 생존율이 더 높게 나타났다. 이에 따라 UV-A의 경우, 유리 포장재에 대한 투과력이 비교적 약한 것으로 확인되었다. UV-A를 식품 산업에 보다 안전하고 효과적으로 이용하기 위해서는 포장재의 적용 범위와 조건 및 다양한 미생물에 대한 생육 억제 효과 등에 대한 연구가 계속적으로

진행 되어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 그람 양성 호기성 유포자 세균 중 자연계에 널리 분포되어 식품에 문제를 일으키는 대표적인 균인 *B. subtilis*를 대상으로 365 nm UV-LED의 생육 억제 효과를 입증하였다. 또한 365 nm UV-LED 조사 시, 식품 포장재로 흔히 사용되고 있는 유리, LLD-PE, Nylon/LDPE 및 PS 등의 포장 조건에 따른 *B. subtilis* 생육 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, *B. subtilis*의 생육 억제 효과가 가장 뛰어난 재질은 Nylon/LDPE와 LLD-PE로 확인되었고, 대조구의 생존율인 $-\log 5$ 값과 비교하여 각각의 생존율은 약 $-\log 2.5-2.9$, $-\log 2.58-3.61$ 로 나타났다. 이 때 재질의 두께가 미생물의 생육에 미치는 영향은 미미한 것으로 관찰되었고, 포장재질에 따라 365 nm UV-LED 투과력이 다르다는 것을 확인할 수 있었다. 통상적으로 $\log 3$ 이상 생균수가 감소하면 99.9% 살균효과가 있는 것으로 나타낼 수 있는데, 본 연구를 통해 365 nm UV-LED가 흔히 사용되고 있는 식품 포장재를 투과하여 균의 생육 억제에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 365 nm UV-LED의 사용이 식품보존과 식품산업 분야의 응용기술로써 잠재력이 있음을 시사하는 바이다.

Acknowledgments

This work was supported by a Research Grant of Pukyung National University (2017 Year).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim JY, Chun HH, Song KB. 2008. Effect of UV-C irradiation on the quality of imported dried fish during storage. *Korean J. Food Preserv.* **15**: 922-926.
- Moosekian SR, Jeong S, Marks BP, Ryser ET. 2012. X-ray irradiation as a microbial intervention strategy for food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **3**: 493-510.
- Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK. 2000. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - a critical review. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 637-645.
- Zhang J, Zivic N, Dumur F, Xiao P, Graff B, Fouassier JP, et al. 2014. UV-violet-blue LED induced polymerizations: Specific photoinitiating systems at 365, 385, 395 and 405 nm. *Polymer* **55**: 6641-6648.

5. Alonso JM, Gacio D, Calleja AJ, Ribas J, Corominas EL. 2012. A study on LED retrofit solutions for low-voltage halogen cycle lamps. *IEEE Trans. Ind. Appl.* **48**: 1673-1682.
6. Min J, Lee CW, Gu MB. 2003. Gamma-radiation dose-rate effects on DNA damage and toxicity in bacterial cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **42**: 189-192.
7. Kim SH, Lee SW, Cho HG, Kim YH, Kim SO. 2014. TiO₂-catalytic UV-LED photo-oxidation of cyanide contained in mine wastewater. *J. Miner Soc. Korea* **27**: 223-233.
8. Mori M, Hamamoto A, Takahashi A, Nakano M, Wakikawa N, Tachibana S, et al. 2007. Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED. *Med. Biol. Eng. Comput.* **45**: 1237-1241.
9. Pourzand C, Tyrrell RM. 1999. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem. Photobiol.* **70**: 380-390.
10. Petersen AB, Gniadecki R, Vicanova J, Thorn T, Wulf HC. 2000. Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B.* **59**: 123-131.
11. Lante A, Tinello F, Nicoletto M. 2016. UV-A light treatment for controlling enzymatic browning of fresh-cut fruits. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **34**: 141-147.
12. Duarte I, Rotter A, Malvestiti A, Silva M. 2009. The role of glass as a barrier against the transmission of ultraviolet radiation: An experimental study. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **25**: 181-184.
13. Ha JW, Back KH, Kim YH, Kang DH. 2016. Efficacy of UV-C irradiation for inactivation of food-borne pathogens on sliced cheese packaged with different types and thicknesses of plastic films. *Food Microbiol.* **57**: 172-177.
14. Manzocco L, Plazzotta S, Maifreni M, Calligaris S, Anese M, Nicoli MC. 2015. Impact of UV-C light on storage quality of fresh-cut pineapple in two different packages. *Food Sci. Technol.* **65**: 1138-1143.
15. Ozen BF, Floros JD. 2001. Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends Food Sci. Technol.* **12**: 60-67.